

土壤磷酸二酯酶 (S-PDE) 试剂盒说明书

(货号:ADS-W-TR066 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤磷酸二酯酶 (S-PDE, EC 3.1.4.1) 是在土壤磷酸单酯酶之后的的第二大磷酸酶。其在土壤有机磷的循环代谢中起到重要作用。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。土壤磷酸二酯酶 (S-PDE) 催化双(4-硝基苯)磷酸酯 (BNPP) 生成黄色的产物 PNP, 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到 S-PDE 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	粉剂 6 支	4°C 避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 2mL 蒸馏水充分溶解, 现配先用, 两天内用完。
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 405 nm。
- ② 在离心管中依次加入下列试剂:

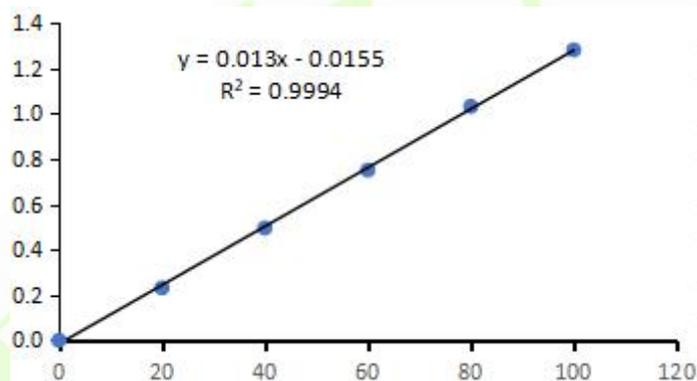
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土

试剂一	500	500
试剂二	100	
37°C (水浴锅或恒温培养箱) 振荡反应 1 h		
试剂三	400	400
试剂二		100
混匀, 12000rpm 室温离心 5min, 立即取上清液 200μL 于 96 孔板中, 立即于 405nm 下读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (参考注意事项)。		

- 【注】: 1.若 A 测定超过 1.5, 可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释 (用水稀释即可), 稀释倍数 D 代入计算公式;
- 2.若ΔA 在零附近徘徊, 可延长 37°C 的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算;
- 3.若同时检测同一背景下的土壤样本, 此批土壤样本可做三次样本自身对照管 (取平均值作为这批土壤样本的对照管), 节省时间; 若是不同背景下的土壤样本 (如黑土, 红土, 黄土等), 则每个样本需做一个自身对照, 即按照说明书加样表操作即可。

五、结果计算:

- 1、标准曲线: $y = 0.013x - 0.0155$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是ΔA。



- 2、活性定义: 在 37°C, 每克土壤每小时水解 BNPP 产生 1nmol PNP 定义为 1 个酶活单位。
 $S\text{-PDE}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0155) \div 0.013] \div W \div T \times D = 76.9 \times (\Delta A + 0.0155) \div W \times D$

W---土壤样品质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

T---催化反应时间, 1 h;

PNP 相对分子质量---139.11。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10μmol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解, 若有结晶析出, 需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 2, 4, 6, 8, 10 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中直接加入: 10μL 标准品+590μL 试剂一+400μL 试剂三, 混匀, 立即取上清液 200μL 于 96 孔板中, 立即于 405nm 下读取吸光值 A。
- 4 根据结果制作标准曲线。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解, 若有结晶析出, 需 37°C 水浴至完全溶解, 标准

品母液浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	590	590
试剂三	400	400
混匀，立即取上清液 200 μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		